دانشگاه پیام نور
دانشکده علوم پایه
مرکز مشهد

پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد
رشته بیوشیمی
گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه :

جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در گلّه های مرغ گوشتی استان خراسان رضوی

نیلوفر لاری

استاد راهنما :
دکتر مجید فرهودی

اساتید مشاور:
دکتر مسعود صالح مقدم
دکتر علیرضا صدر بزاز

اسفند ماه ۱۳۹۰

Payame Noor University

Faculty of Science

Mashhad

Thesis Submitted for the Award of Master of M.Sc in Biology-Biochemistry

Department of Biochemistry

Title:

Isolation, Identification and Antibiotic susceptibility test of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler chickens flocks of Razavi Khorasan province

NiloofarLari

Supervisor:

Dr. Majid Farhoodi

Advisors:

Dr. Masoud Salehmoghadam

Dr. Alireza Sadrebazzaz

March, 2012

در تدوین این پایان نامه از حمایت های مالی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شمال شرق کشور، مشهد، استفاده گردیده است. لذا برخود واجب می دانم از زحمات بی شائبه این مؤسسه تشکر و قدردانی نمایم.

تشکر و سپاس فراوان از:

- استاد راهنمای گرانقدر، آقای دکتر مجید فرهودی، که با دقت و صبر و برد باری خود از هیچ کوشش و مساعدتی برای دستیابی وبه تحقق رساندن اهداف این پایان نامه دریغ نفرمودند.
- اساتید مشاور گرانقدر، آقای دکتر مسعود صالح مقدم و آقای دکتر علیرضا صدر بزاز، که با راهنمایی ها و مشاوره های خود ، مرا در رسیدن به اهدافم بهره مند ساختند.
- استاد داور گرانقدر، آقای دکتر حسن رخشنده، که داوری پایان نامه مرا به عهده گرفتند.
- کلیّه پرسنل و همکاران مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد که با همکاری خود مرا در راستای انجام این پایان نامه یاری رساندند.

تقدیم به پدر و مادر مهربانم

که هیچگاه دست از پشتیبانی من در رسیدن به اهدافم برنداشتند

و همیشه و در همه حال یاریم رساندند.

چکیده :

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) بعنوان یک عامل باکتریایی نوظهور در صنعت مرغداری های کشور مدنظر می باشد. اثبات وجود بیماری و تشخیص قطعی آن در مرغداری های استان خراسان رضوی، گامی مؤثر در راستای کاهش تلفات و ضایعات اقتصادی می تواند باشد. این تحقیق جهت جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریORT انجام پذیرفته است. این باکتری، گرم منفی میله اي شکل و چند شکلی می باشد که بیشتر، دستگاه تنفس طیور را درگیر کرده و بیماری های دیگر تنفسی را نیز پیچیده می کند. این تحقیق بر روی ۱۵۰ نمونه از بافت ریه طیور با علائم بیماری تنفسی صورت پذیرفت. نمونه های ریه مبتلا، از کلینیک های بخش خصوصی و کشتارگاه طیور مشهد اخذ گردیدند. کلیّه ریه های مبتلا در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل و در محیط های اختصاصی کشت داده شدند. بر روی کلنی های مشکوک آزمایشات بیوشیمیایی اختصاصی انجام پذیرفت، که تعداد ۴ نمونه به تأئید اولیّه رسیدند. پس از استخراج DNA باکتری های فوق، با آزمایش PCR کلیه نمونه ها تأئید مولکولي نهائي شدند. سپس بر روی نمونه های جداشده ی فوق آزمایش آنتی بیوگرام انجام پذیرفت، و بر اساس نتایج، کلیّه نمونه ها به آنتی بیوتیک های سولتریم، جنتامایسین، اریترومایسین، و کولستین مقاوم و به آنتی بیوتیک های تیامولین، اکسی ترا سایکلین، فورازولیدون، فلورفنیکل، انروفلوکسا سین، داکسی سایکلین، کلراتراسایکلین، دانوفلوکساسین و کلرامفنیکل حساس بودند. ۲ نمونه از باکتری ها نسبت به

آنتی بیوتیک نئومایسین حساسیت نشان دادند، در صورتیکه ۲ نمونه دیگر نسبت به این آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین ۱ نمونه نسبت به لینکومایسین و فلومیکوئین حساسیت، و نمونه ی دیگر نسبت به دایفلوکساسین از خود حساسیت بروز دادند، در حالیکه بقیه نمونه ها به این آنتی بیوتیک ها مقاوم بودند.

واژه گان کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینو تراکئال – جداسازی – آنتی بیوگرام – واکنش زنجیره ای پلیمراز- استان خراسان رضوي- ایران.

فـهـرست صفـحـه

چکیده

فصل اول: کلیّات ۱

۱-۱) مقدمه ۲

۱-۱-۱) تاریخچه بیماری ۳

۱-۱-۲) رده بندی باکتری ٤

۱-۱-۳) نیازمندی های رشد باکتری ٥

۱-۱-۴) مورفولوژی باکتری ٦

۱-۱-۵) ویژگی های بیوشیمیایی باکتری ۸

۱-۱-۶) انواع سروتیپ های باکتری ۱۰

۱-۱-۷) میزبان های طبیعی باکتری ۱۱

۱-۱-۸) علائم بالینی بیماری ۱۲

۱-۱-۹) یافته های آسیب شناسی ۱۳

۱-۱-۹-۱) یافته های ماکروسکوپی ۱۳

۱-۱-۹-۲) یافته های میکروسکوپی ۱٤

۱-۱-۱۰) روش های تشخیص باکتری ۱۵
۱-۱-۱۱) روش های انتقال باکتری ۱۶
۱-۱-۱۱-۱) انتقال به صورت افقی ۱۶
۱-۱-۱۱-۲) انتقال به صورت عمودی ۱۶
۱-۱-۱۲) روش های پیشگیری و درمان ۱۷
۱-۱-۱۲-۱) واکسیناسیون ۱۷
۱-۱-۱۲-۲) درمان ۱۸
۱-۲) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۱۹
۱- ۲-۱) تاریخچه PCR ۱۹
۱-۲-۲) PCR چیست؟ ۱۹
۱-۲-۳) اجزاء PCR ۲۰
۱-۲-۴) مراحل PCR ۲۲
۱-۲-۴-۱) واسرشت یا تقلیب حرارتی ۲۲
۱-۲-۴-۲) اتصال پرایمر ۲۲
۱-۲-۴-۳) تکثیر رشته مکمل ۲۳

۱-۲-۵) خطای جفت شدن ۲۵

۱-۳) آنتی بیوگرام ۲۷

۱-۳-۱) انواع روش هاي آنتي بيوگرام ۲۷

۱-۳-۱-۱) روش سریالی ۲۸

۱-۳-۱-۲) روش دیسکی ۲۸

۱-۳-۲) روش استاندارد آنتی بیوگرام ۳۰

۱-۳-۳) نحوه گزارش نتایج آنتی بیوگرام ۳۰

فصل دوم: مواد و روش ها ۳۱

۲-۱) تجهیزات و مواد مصرفی آزمایشگاهی ۳۲

۲-۱-۱) تجهیزات آزمایشگاهی جهت جداسازی باکتریORT
..... ۳۲

۲-۱-۲) مواد مصرفی جهت جداسازی باکتری ORT .. ۳۳

۲-۱-۳) تجهیزات آزمایشگاهی جهت آزمایش PCR ۳٤

۲-۱-۴) مواد مصرفی آزمایش PCR ۳٤

۲-۱-۵) تجهیزات آزمایشگاهی جهت آزمایش آنتی بیوگرام
..... ۳۵

۲-۱-۶) مواد مصرفی جهت آنتی بیوگرام ۳۵

۲-۲) محیط سازی ۳۶

۲-۲-۱) روش تهیه محیط بلاد آگار ۳۶

۲-۲-۲) روش تهیه محیط مایع برین هارت براث . ۳۷

۲-۲-۳) روش تهیه محیط مولرهینتون آگار ۳۸

۲-۳) تهیه معرف های رنگ آمیزی ۳۸

۲-۴) نحوه محاسبه آماری حجم نمونه های اخذ شده ۴۰

۲-۵) جداسازی باکتری ۴۱

۲-۶) آزمایشات بیوشیمیایی ۴۲

۲-۶-۱) آزمایش هیدروکسید پتاسیم(KOH) ۴۲

۲-۶-۲) رنگ آمیزی گرم ۴۳

۲-۶-۳) آزمایش کاتالاز ٤٥

۲-۶-۴) آزمایش اکسیداز ٤٦

۲-۶-۵) عدم رشد بر روی محیط مک کانکی آگار ٤٧

۲-۷) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ٤٨

۲-۸) آنتی بیوگرام ٥٥

فصل سوم : نتایج ۵۸

۳-۱) جداسازی ۵۹

۳-۲) آزمایشات بیوشیمیایی ۶۰

۳-۳) رنگ آمیزی گرم ۶۱

۳-۴) آزمایش PCR ۶۲

۳-۵) آنتی بیوگرام ۶۳

فصل چهارم : بحث و پیشنهادات ۶۶

٤-۱) بحث ۶۷

۴-۲) نتیجه گیری نهایی ۷۳

٤-۳) پیشنهادات ۷٤

منابع ۷۵

فهرست اشکال صفحه

۱-۱-۴) شکل باکتری ORT در زیر میکروسکوپ..... ۷

۱-۲-۴) سینتیک PCR ۲٤

۱-۲) مراحل واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۶

۲-۶-۱) آزمایش KOH ٤۲

۲-۶-۳) آزمایش کاتالاز ٤٥

۲-۶-۴) آزمایش اکسیداز ٤٦

۲-۷-۱) ورتکس ٤۹

۲-۷-۲) سانتریفیوژ یخچال دار ٥۰

۲-۷-۳) دستگاه ترموسایکلر ٥۲

۲-۷-۴) تانک الکتروفورز ٥٤

۲-۷-٥) دستگاه تراس ایلومینوتور ٥٤

۳-۱) تصویر کلنی باکتری ORT بعد از ۴۸ ساعت ٥۹

۳-۳) مورفولوژی باکتریORT ٦۱

۳-۴) نتیجه PCR باکتری ORT ٦۲

۳-٥-۱) تصویر هاله عدم رشد باکتری ORT در آزمایش آنتی بیوگرام ٦٥

۳-٥-۲) تصویر هاله عدم رشد باکتری ORT در آزمایش آنتی بیوگرام ٦٥

فهرست جداول صفحه

۱-۱-۵) ویژگی های بیوشیمیایی باکتری ORT ۹

۲-۸) منطقه ی عدم رشد باکتری ۵۷

۳-۲) نتیجه آزمایشات بیوشیمیایی باکتری ORT ۶۰

۳-۵) نتایج آنتی بیوگرام ۶۴

فصل اول

کلیّات

۱-۱) مقدمه:

تأمین گوشت سفید و پروتئین یکی از مهمترین مسائل درگیر در هر کشوری در بحث تغذیه جامعه می باشد. در این میان تهیه گوشت مرغ که یکی از پر مصرف ترین منابع پروتئینی است، از مسائل و مشکلات بیشماری برخوردار می

باشد، که شیوع بیماری های مختلف از اهم آن هاخواهد بود. بیماری نسبتاً نو پدید اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال طیور در برخی از مناطق کشور از اهمیت به سزایی برخوردار بوده، لیکن در خراسان رضوی سئوالات زیادی در رابطه با این بیماری مطرح می باشد که تاکنون بی پاسخ مانده است. این پایان نامه جهت پاسخگویی به سئوالات در باب بیماری فوق، در خراسان رضوی اجرا شده است.

اساس این پایان نامه برپایه آزمایش مولکولی PCR انجام پذیرفت، و پرایمرهای اختصاصی بکار گرفته شده در این آزمایش بر اساس ژن باکتریاورنیتوباکتریوم رینوتراکئال با ردیف بازهای نوکلئوتیدی به شرح ذیل مورد استفاده قرار گرفت(*Hafez, M. H. 2002*):

OR16S-F1: 5′- GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G-3′

OR16S-R1: 5′ – TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT – 3′

نتایج حاصل حاکی از آن بود که بیماری فوق در منطقه حضور داشته و مدیران مسئول بایستی طرح های جامع تری در خصوص پیشگیری از بیماری به مرحله اجرا درآورند تا به نوعی از میزان تلفات حاصله کاسته شود، و تولید پروتئینی بیشتر با کیفیت بالاتر در سرلوحه امور دامپزشکی قرار گیرد.

۱ -۱-۱) تاریخچه بیماری :

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال[1](ORT)،باکتری نسبتاً جدیدی در طیور است، که در بیشتر کشورهای جهان به عنوان عاملی مطرح در بیماری های تنفسی شناخته و گزارش شده است(*Hafez, M. H., 2002*).

اولین بار باکتریORTدر سال ۱۹۸۱، در آلمان شمالی و از بوقلمون های ۵هفته ای کهدارای علائم آب ریزشبینی و ورم صورت بودند، جدا گردید.در سال ۱۹۸۶، جداسازیORTاز بوقلمون های اسرائیلی که دچارپنومونی شدید بودند، انجام پذیرفت . بین سال های ۱۹۸۶و ۱۹۸۸ در انگلستان، باکتریORTراکه منجر به کاهش تولید تخم، سرفه ، فیبرینه شدن ریه و افزایش میزان مرگ و میر دربین گلّه های پرورش بوقلمونشده بود، جدا کردندو آن را باکتری شبه-پاستورلا[2]نام نهادند(*Saif, Y.M.2003*).

اولین بار Charltonدرسال ۱۹۹۳مؤفق به جمع آوری و جداسازی ۱۴نمونه مبتلا بهباکتری ORT،در طی سال های ۱۹۹۰تا ۱۹۹۱ شد(*Charlton, B.,et al., 1993*).در همان سال، Vandammeژنوتیپ وانواع سویه های آن را مشخص و در نهایتنامآن را"اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال"پیشنهاد داد(*Vandamme, P., et al., 1994*).

در ایران، اولّین بار دکتر بنانی و همکارانشان در سال ۲۰۰۱،ORTرا از یک گلّه مرغ گوشتی و یک گلّه پولت تخمگذار

---

[1] Ornithobacterium rhinotracheale

[2] Pasteurella-like

جدا سازی و شناسایی‌کردند(منصور بنانی و همکاران؛ ۱۳۷۸)، لیکن گزارش های معدودی از حضور این باکتری در سایر استان هاموجود می باشد (*Asadpour, Y., et al.,2008; Rahimi, M. and Banani, M., 2007;Ghanbarpour, R. and Salehi, M., 2009*)

۱-۱-۲) رده بندی باکتری :

در حال حاضر ORTرا متعلق بهشاخه باکتروئیدها -فلاووباکتریا می دانند،و در گذشته این باکتری را بهعنوان شبه-پاستورلا[۱]، شبه-کینگلا[۲]، تاکسون ۲۸[۳]، یا میله ای گرم منفی چند شکلی نیز می شناختند(*Vandamme, P.,et al., 1994*).

۱-۱-۳) نیازمندی های رشد باکتری :

رشد باکتریORTبصورت هوازی ، نیمه هوازی و بی هوازی بوده وبهترین دما برای رشد آن37^0C است، امّاقادر به تحمل دمای

[۱] Pasteurella-like

[۲] Kingella-like

[۳] Taxon 28

$30-42^0C$نیز می باشد.باکتری بر روی آگار ۱۰-۵درصد خون گوسفندی[۱]همراه با ۱۰-۷ درصد CO_2حداکثر رشد را خواهد داشت، اگر چه بر روی تریپتوز آگار[۲]و آگار شکلاتی[۳] هم می تواند به سهولت رشدکند. باکتری بر روی محیط مک کانکیآگار رشد نمی کند. رشد ORTدر محیط مایع می تواند بسته به گونه، و محیط کشتآن متفاوت باشد، لیکن محیط های مایع دیگری از جمله برین هارت[۴] ، و تاد هویت[۵] احتیاجات این باکتری را تأمین می کنند (*Saif, Y.M.,* *2003; Charlton, B. R., et al., 1993*).

۱-۱-۴) مورفولوژیباکتری:

باکتری ها را از نظر خصوصیت رنگ آمیزی به دو دسته گرم منفی و گرم مثبت تقسیم می کنند، که درواقع این اختلاف در پذیرش رنگ، بعلت اختلاف در ساختمان دیواره سلولی این

---

[۱] Sheep blood agar

[۲] Tryptose soy agar

[۳] Chocolate agar

[۴] Brain Heart broth

[۵] Todd Hewitt broth